

Universidade Federal de São Paulo  
Campus Diadema

VITÓRIA SOUSA FRUTUOSO

Efeito de mutações identificadas em pacientes com  
Hipotireoidismo Congênito (HC) na atividade da tireoperoxidase  
(TPO)

Diadema  
2021

VITÓRIA SOUSA FRUTUOSO

Efeito de mutações identificadas em pacientes com Hipotireoidismo Congênito (HC)  
na atividade da tireoperoxidase (TPO)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência parcial para obtenção do título de  
Bacharel em Ciências Biológicas, ao Instituto de Ciências  
Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade  
Federal de São Paulo – Campus Diadema.

Orientadora: Ileana Gabriela Sanchez de Rubio

Diadema  
2021

VITÓRIA SOUSA FRUTUOSO

Efeito de mutações identificadas em pacientes com Hipotireoidismo Congênito (HC)  
na atividade da tireoperoxidase (TPO)

Orientadora: Profa. Dra. Ileana Sanchez de Rubio

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial para a obtenção do  
título de bacharel do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de São Paulo,  
campus Diadema

Aprovada em: 18/02/2021

Presidente da banca:



Profa. Dra. Ileana Gabriela Sanchez de Rubio

Universidade Federal de São Paulo

Avaliadores:



Prof. Dr. Rodrigo Esaki Tamura

Universidade Federal de São Paulo



Prof. Dr. Caroline Serrano do Nascimento

Universidade Federal de São Paulo

### **Agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu tio João Gonçalves por ter custeado e acreditado na importância da minha educação por toda minha vida. Sem ele nada disso teria sido possível.

Minha mãe, Neusa Sousa, que se dedicou tanto para eu tivesse a chance de realizar meu sonho - ser bióloga

Minha irmã, Sophia, e minha tia, Zita, pelo carinho e zelo constante. Meus padrinhos, Sandra e Pedro, por me mostrarem que as bases genéticas são importantes, mas que os laços do coração muitas vezes superam os sanguíneos. Minhas melhores amigas desde a infância, Ana Carolina e Júlia, com quem dividi todos os momentos da minha vida e que me impulsionam sempre. Meus amigos de faculdade: Uehara, Karine, Núbia, Jussara, Possari, Lenin, Samu, Ju Abud e Sara, que tornaram esse período de graduação inesquecível. Meu namorado, Ranon, por não me deixar desistir da escrita desse trabalho. E, por último, mas não menos importante: aos professores, Ileana Rúbio e Rodrigo Tamura, e parceiros de laboratório: Mariana, Luã, Gabriela e Rodrigo Suetsugu que me ensinaram com tanta humildade (praticamente) tudo o que sei.

Saibam que eu sei o tamanho da minha sorte por ter cada um de vocês na minha vida.

*Com cuidado examino*

*Meu plano: Ele é*

*Grande, ele é*

*Irrealizável*

*Bertold Brecht*

8

## **Resumo**

O hipotireoidismo congênito (HC) é caracterizado pela deficiência dos hormônios tireoidianos e é a causa mais comum de retardo mental que pode ser prevenida quando diagnosticada e tratada precocemente. O diagnóstico da doença é realizado através da triagem neonatal (popular "teste do pezinho") que possui alta sensibilidade e poucos falsos-negativos. A incidência de HC é de 1:3000 a 1:4000 nascidos vivos e pode variar de acordo com fatores étnicos e consanguinidade. Mutações em diversos genes já foram associadas ao HC, entre elas, no gene da tireoperoxidase (TPO). A TPO é uma enzima localizada na membrana apical da tireoide que desempenha papel central na síntese dos hormônios tireoidianos. Mutações que afetam sua estrutura, sua atividade enzimática ou sua localização são os defeitos genéticos mais frequentes da síntese dos hormônios tireoidianos. Em pesquisas anteriores de nosso grupo, foram identificadas diversas mutações no gene da TPO em pacientes com HC por defeito de síntese, assim este projeto teve como objetivo avaliar o efeito de duas mutações, a p.Cys296Alafs\*21 (c. DelT886) e a p.Arg665Trp (c.2083C>T), identificadas em dois irmãos com bócio fetal, na atividade enzimática da TPO *in vitro* e verificar se poderiam ser associadas ao fenótipo dos pacientes. O plasmídeo com a TPO com a mutação p.Arg665Trp, foi obtido por mutagênese sítio dirigida utilizando o vetor pCDNA 3.1 contendo o cDNA da TPO selvagem e o plasmídeo com a mutação p.Cys296Alafs\*21 foi obtido previamente no laboratório. Após padronização da técnica, as células HEK293A foram transfectadas de maneira transiente utilizando o reagente Lipofectamina 3000. Para avaliar a atividade enzimática foi utilizado o reagente Amplex UltraRed, um substrato incolor que na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e por ação da TPO se converte em resorufina fluorescente e a atividade das TPOs mutadas foi comparada com a da TPO selvagem. Nas células expressando a TPO selvagem verificamos valores de fluorescência elevados quanto que baixos valores de fluorescência foram observados em aquelas expressando os mutantes de TPO, similares aos da linhagem com o pCDNA3.1, controle negativo. Estes resultados sugerem que ambas mutações

diminuem a atividade da TPO, o que explicaria o HC severo dos pacientes sugerindo uma correlação entre o genótipo e fenótipo.

Palavras-chave: Hipotireoidismo congênito. Tireoperoxidase. Amplex UltraRed. Mutações.

9  
10

### **Abstract**

Congenital hypothyroidism (HC) is described as deficiency of thyroid hormones at birth and is the most common cause of mental retardation that can be prevented when diagnosed and treated early. The diagnosis of the disease is carried out through neonatal screening, which has high sensitivity and few false negatives. The incidence of HC is 1: 3000 to 1: 4000 live births and may vary according to ethnic factors and consanguinity. Mutations in several genes have already been associated with HC, including the gene of thyroperoxidase (TPO). TPO is an enzyme located in the apical membrane of the thyroid that plays a central role in the synthesis of thyroid hormones. Mutations that affect its structure, enzyme activity or location are the most common genetic defects in the synthesis of thyroid hormones. In previous research by our group, several mutations in the TPO gene were identified in patients with CH due to a synthesis defect, thus this project aimed to evaluate the effect of two mutations, p.Cys296Alafs\*21 (c.DelT886) and p.Arg665Trp (c.2083C>T) identified in patients with fetal goiter, on the enzymatic activity of the TPO *in vitro* and to verify if it can be associated with the phenotype of patients. The TPO plasmid with the p.Arg665Trp mutation was obtained by site-directed mutagenesis using the pCDNA 3.1 vector with the TPO cDNA and the plasmid with the p.Cys296Alafs\*21 mutation was previously obtained in the laboratory. After standardization of the technic, HEK293A cells were transiently transfected using the Lipofectamine 3000 reagent. To evaluate an enzymatic activity, the Amplex UltraRed reagent was used. The activity of the mutated TPO was compared to wild type TPO. The cells expressing wild type TPO, high fluorescence values where observed compared with the low fluorescence values observed in those expressing the mutants TPO, similar values of the cells transfected with pCDNA3.1, negative control. These results suggested that both mutations decrease the activity of TPO, which would explain the severe HC of the patients suggesting a correlation between the genotype and phenotype.

Keywords: Congenital hypothyroidism. Thyroperoxidase. Amplex UltraRed.

**Sumário**

<b>1. Introdução .....</b>	<b>12</b>
1.1 .....	<i>Hipotireoidismo</i>
<i>Congênito.....</i>	<i>12 1.2</i>
<i>Tireoperoxidase (TPO) .....</i>	<i>14 3.</i>
<i>Mutações. ....</i>	<i>19</i>
3.1 <i>p.Cys296Alafs*21DelT886 .....</i>	<i>19</i>
3.2 <i>p.Arg665Trp .....</i>	<i>19</i>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>20</b>
<b>5. Pacientes e Métodos.....</b>	<b>21</b>
5.1 <i>Pacientes .....</i>	<i>21</i>
5.2 <i>Mutagênese .....</i>	<i>sítio</i>
<i>dirigida .....</i>	<i>21 5.3 Transformação</i>
<i>bacteriana .....</i>	<i>22 5.4Extração DNA</i>
<i>plasmidial .....</i>	<i>22 5.5 Quantificação</i>
<i>do DNA plasmidial .....</i>	<i>22 5.6 Polymerase</i>
<i>chain reaction (PCR) .....</i>	<i>23 5.7</i>
<i>Sequenciamento .....</i>	<i>23 5.8</i>
<i>Linhagem Celular .....</i>	<i>24 5.9</i>
<i>Avaliação da sensibilidade da célula HeLa ao antibiótico geneticina .....</i>	<i>24</i>
5.10 <i>Transfecção .....</i>	<i>24</i>
5.11 <i>Extração de DNA de Células de Mamíferos .....</i>	<i>25</i>
5.12 <i>Padronização do Protocolo de Amplex UltraRed .....</i>	<i>25</i>
<b>6. ....</b>	
<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
6.1 <i>Experimentos 1 e 2 .....</i>	<i>28</i>
6.2 <i>Experimento 3 .....</i>	<i>30</i>
6.3 <i>Experimento 4 .....</i>	<i>30</i>
6.4 <i>Verificação da presença de TPO nas linhagens .....</i>	<i>32</i>
6.5 <i>Experimento 5 .....</i>	<i>33</i>
6.6 <i>Experimento 6 .....</i>	<i>35</i>
<b>7. Discussão .....</b>	<b>36</b>
<b>8. Conclusão .....</b>	<b>38</b>
<b>9. Referências.....</b>	<b>39</b>

## 1. Introdução

### 1.1 Hipotireoidismo Congênito

O hipotireoidismo congênito (HC) é definido como a deficiência dos hormônios tireoidianos ao nascimento e é a causa mais comum de retardo mental que pode ser evitada com tratamento precoce (RASTOGI e LAFRANCHI, 2010). A maioria dos casos de HC esporádicos se deve a distúrbios do desenvolvimento da glândula tireoide, conhecidos como disgenesias, que incluem a ausência completa de tecido tireoidiano (agenesia), tireoide de pequeno porte (hipoplasia) e tireoide localizada fora do local habitual (ectopia). Em menor frequência o HC ocorre por defeitos na síntese do hormônio tireoidiano, chamados de disormonogêneses tireoidianas. (AVBELJ et al., 2007).

Quando a triagem neonatal para HC foi introduzida a incidência do HC era de 1:3.000 – 4.000 nascidos vivos (HINTON et al., 2010). Ao longo dos anos, um aumento nesta incidência vem sendo observada com taxas entre 1: 1.600 e 1: 2.800 nascidos vivos. Entre os fatores que influenciam a incidência do HC na população, assim como a incidência dos diferentes fenótipos do HC, podemos citar: 1) *alterações de parâmetros avaliados pelos programas de triagem neonatal*, um exemplo é a redução dos níveis de corte, que podem resultar em uma maior identificação de formas mais brandas de HC. (MITCHELL et al., 2011; OLIVIERI et al., 2015) 2) *composição étnica*, pois diferentes grupos étnicos têm mostrado que possuem diferentes pré disposições para HC. (OLIVIERI, 2015). O fator étnico é tão relevante que as mutações e frequências de disgenesias e disormonogêneses variam em diferentes regiões, por exemplo, a maioria dos casos de hipotireoidismo congênito na China são causados por disormogêneses e não disgenesias. (SUN et al., 2018); 3) *relações consanguíneas* entre os pais é outro fator importante. Em um estudo italiano, foi observado que bebês com HC nascidos de pais consanguíneos apresentaram frequência significativamente maior de tireoide normal ou hiperplásica do que de disgenesia tireoidiana (65% vs 35%,  $P < 0,05$ ), sugerindo uma alta ocorrência de disormonogênese determinada geneticamente (OLIVIERI et al., 2015) ; 4) *sobrevivência de bebês prematuros*, as melhorias na saúde de neonatos vêm aumentando a taxa de sobrevivência na prematuridade, o que também tem um papel significativo, já que é comum que esse grupo apresente HC (FISHER et al., 1979; LAIN et al., 2017).

Em geral, os recém nascidos com HC são assintomáticos ou apresentam sintomas muito sutis ao nascimento. Se não for tratado, o hipotireoidismo leva ao aumento de TSH,



tireoidiana e surgimento de bócio quando há tecido tireoidiano, na tentativa de compensar a capacidade diminuída da glândula tireoide de produzir o hormônio tireoidiano (Figura 1). A falta de hormônio provoca danos mentais irreversíveis, pois estes têm um papel fundamental para a maturação do sistema nervoso central. Os sintomas clássicos de HC não tratado incluem inflamação prolongada, letargia, má alimentação, constipação, secreção auricular. (HANLEY et al., 2016; RIS-STALPERS e BIKKER, 2010). Outras características clínicas comuns são hérnia umbilical, macroglossia e pele úmida (HANLEY et al., 2016). Além disso, estudos sugerem que pacientes adultos com hipotireoidismo congênito têm maior risco de desenvolverem obesidade e de terem a função diastólica comprometida. (SALERNO et al., 2008; WONG et al., 2004).



*Figura 1 Recém-nascido apresentando massa cervical devido bócio congênito (PEREIRA, 2011)*

O diagnóstico e tratamento precoce (antes de 1 mês de vida) permitem um desenvolvimento físico e mental normal, sendo essa a observação que levou a comunidade médica a propor os programas de rastreamento (GRÜTERS e KRUDE, 2012). Assim, o teste de triagem neonatal, comumente chamado de “teste do pezinho”, é um programa que tem como objetivo identificar crianças que possuem HC. O diagnóstico deve ser feito no período neonatal, entre o 2º e 5º dia de idade o que permite o pronto início da reposição do hormônio tireoidiano, no primeiro mês de vida (KAPLOWITZ, 2019). Se a realização do teste acontecer antes de 2 dias de vida, podem ser obtidos resultados falsos-positivos, pois há uma liberação

após o nascimento, ou falsos-negativos pela presença de hormônios maternos (HANLEY et al., 2016; KLEIN et al., 1972).

Caso o teste dê positivo, a criança deve iniciar o tratamento imediatamente, através da ingestão de uma única dose oral do hormônio tireoidiano, levotiroxina (T4), pela manhã. A reabsorção da levotiroxina oral é excelente, e as diferenças na cinética individual que possam existir são superadas pelo ajuste da dose de acordo com o nível de TSH (GRÜTERS e KRUEDE, 2012). Após o início da terapia, a recomendação usual é o monitoramento dos níveis de TSH e T4 em intervalos semanais por 1 mês, em intervalos mensais por 3 meses, seguido por um acompanhamento contínuo a cada 3 meses durante os primeiros 2 anos de vida e posteriormente a cada 6 meses (GRÜTERS e KRUEDE, 2012). Aos 3 anos de idade o tratamento é suspenso quando não há mais risco de dano neuronal. Nessa idade são feitos exames confirmatórios e o diagnóstico etiológico (DELANGUE e CZERNICHOW, 1990). A ultrassonografia da tireoide também pode ser utilizada à fim de determinar casos de disgenesia tireoideana por hipoplasia ou aplasia, porém é menos precisa para identificar tecidos tireoidianos ectópicos. (HANLEY et al., 2016).

O hipotireoidismo congênito é, em geral, caracterizado como esporádico, mas até 2% dos casos é classificado como de origem familiar (CASTANET, 2002). As disormonogêneses apresentam um padrão de herança autossômico recessivo, e maioria dos casos ocorrem por mutações nos genes: TPO, TG, SLC26A4, DUOX2, DUOXA2, IYD e NIS. (GRÜTERS e KRUEDE, 2012; NARUMI et al., 2011). Por sua vez, o padrão de herança das disgenesias ainda não está bem definido, alguns autores as consideram como autosômicas dominantes. Mutações associadas às disgenesias foram identificadas nos genes: FOXE1, NKX2- 1 e NKX2- 5, PAX8 e TSHR, estes dois últimos também em casos familiares (BRUST, 2014). Em 2018 um estudo na China relatou um padrão de herança autossômico recessivo para um caso de disgenesia tireoidiana associado a DUOX2 (SUN et al., 2018). E um grupo brasileiro também associou mutações em DUOX2, que até aquele momento só tinham sido descritas em disormonogêneses, à ectopia (KIZYS, 2017).

### 1.2 Tireoperoxidase (TPO)

---

As mutações mais frequentes associadas às disormonogêneses foram localizadas no gene da tireoperoxidase (TPO). Estas mutações podem promover a substituição, deleção ou

adição de aminoácidos provocando perda de atividade por alterações estruturais na proteína,

15

perda de atividade enzimática e/ou de localização no tireócito (DELADOËY et al., 2008). A atividade enzimática de TPO foi descrita décadas atrás e já naquela época pôde ser associada ao tipo mais frequente de defeito de síntese tireoidiana. (DEGROOT e NIEPOMNISZCZE, 1977). A atividade enzimática da TPO é altamente dependente de níveis adequados do elemento iodo. Dessa maneira, é provável que a disponibilidade de iodo seja um determinante para defeitos de organificação também (RIS-STALPERS e BIKKER, 2010).

A TPO é uma enzima glicosilada localizada na membrana apical da tireoide que é responsável por três importantes reações de síntese dos hormônios tireoidianos: 1) oxidação de íons iodeto para formação de átomos de iodo 2) iodação das tirosinas da tireoglobulina (Tg), processo chamado de organificação e 3) o acoplamento das tirosinas iodinizadas para a formação dos hormônios  $T_3$  e  $T_4$ , na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (TAUROG, 1996; LARSEN 2003) (Figura 2).

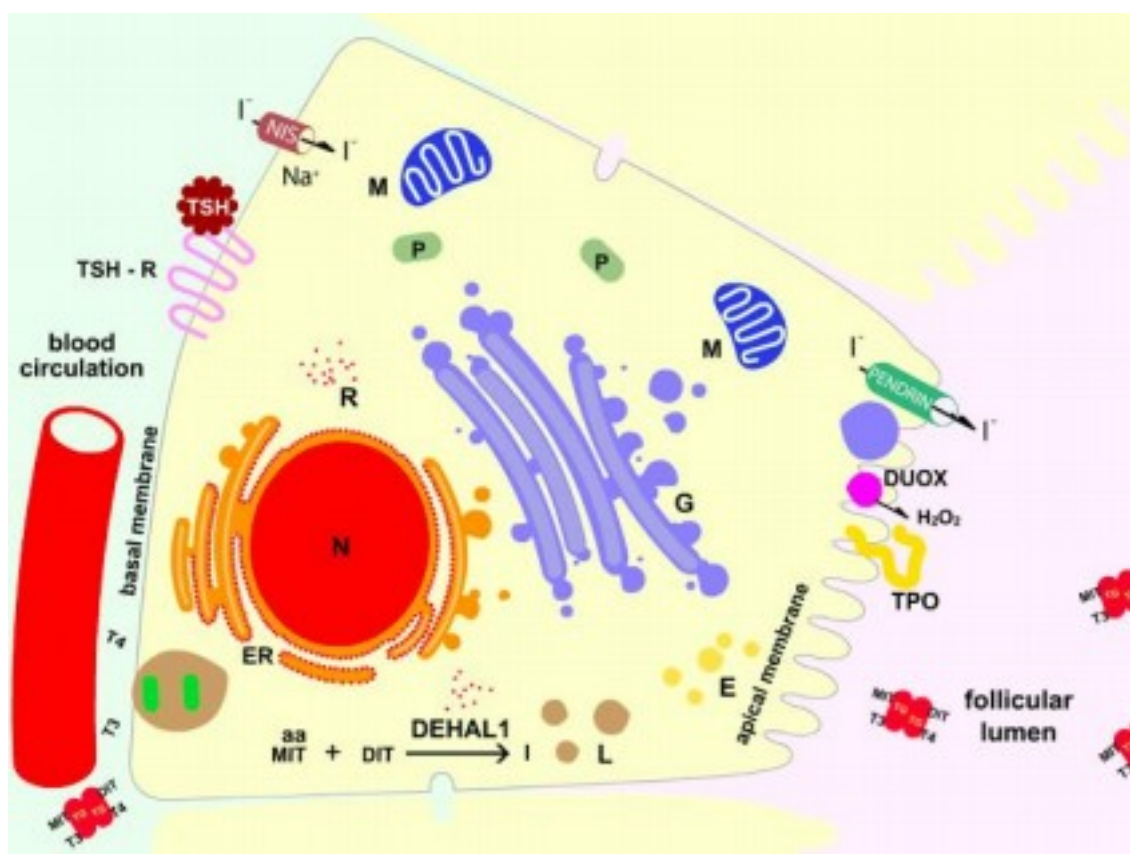
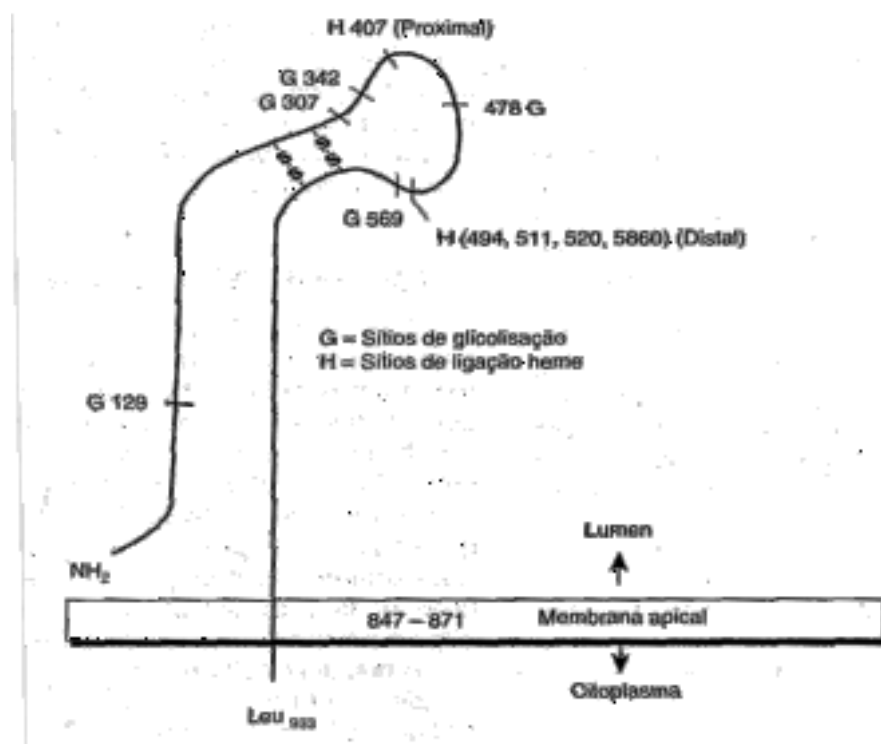


Figura 2. Tireócito e lúmen folicular. A TPO pode ser visualizada na membrana apical do tireócito consumindo  $H_2O_2$  gerado por DUOX e formando os hormônios  $T_3$  e  $T_4$  no lúmen folicular. (PARDO, 2008)

16

A TPO é encontrada como um dímero e cada monômero consiste em 933 resíduos de aminoácidos contendo um domínio de peroxidase, três domínios extracelulares adicionais, uma hélice transmembrana e uma cauda intracelular C-terminal curta (Figura 3). A TPO está na família de peroxidases de mamíferos contendo heme, que inclui a lactoperoxidase (LPO), mieloperoxidase (MPO) e peroxidase de eosinófilos (EPO) (RUF e CARAYON, 2006) e sua estrutura terciária completa permanece desconhecida, no entanto, a alta identidade de sequência com proteínas de estruturas conhecidas forneceu alguns insights sobre a organização tridimensional da TPO por modelagem por homologia (GODLEWSKA et al., 2019). O gene da TPO tem sua transcrição controlada pelos fatores de transcrição NKX2.1, FOXE1 e PAX8. (ESPOSITO et al., 1998)



*Figura 3 esquema da proteína TPO localizada na membrana apical do tireócito, mostrando os sítios de glicosilação (G) e sítios de ligação heme (H). (Adaptado de TAUROG, 1996)*

O gene da TPO está localizado no locus 25 no cromossomo 2, possui 17 éxons e 16 íntrons (KIMURA et al., 1989). Já foram identificadas mais de 60 mutações em homozigotes ou heterozigotes compostas em TPO, com padrão de herança autossômico recessivo

(NASCIMENTO et al., 2003) e alguns casos com mutações com possível expressão monoalélicas (NEVES, 2008). O funcionamento ideal da TPO exige sua localização correta na membrana apical do tireócito, manutenção da sua estrutura proteica e o sítio catalítico íntegro (RUF e CARAYON, 2006).

Os éxons 7-11 codificam o centro catalítico da proteína TPO (região de ligação ao heme) que é a região “funcional” do gene da TPO, crucial para a atividade enzimática (BIKKER et al., 1995). Achados anteriores também indicam que as regiões mais suscetíveis a mutações são os éxons 7-14, mais especificamente nos 8, 9 e 10 (HASHEMIPOUR et al., 2012). Assim, espera-se que mutações nessas regiões sejam de grande importância, resultando em defeitos graves de organificação e hipotireoidismo severo. (SIMM et al., 2009).

Estudos já demonstraram que pacientes com mutação em TPO comumente apresentam defeitos graves na produção do hormônio tireoidiano, HC permanente grave acompanhado de bócio, níveis séricos de Tg extremamente altos e defeito na organificação do iodeto, podendo esse defeito de organificação ser total ou parcial, determinado pela descarga de iodeto positiva no teste de perclorato (GURIA et al., 2014; NARUMI et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2003). Em pacientes com suspeita de deficiência de TPO completa ou parcial, a atividade enzimática de TPO pode ser avaliada *in vivo* através do teste de descarga de perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ) (Figura 4). Devido aos níveis elevados de TSH, os pacientes apresentam uma captação inicial muito rápida de radioiodo que atinge um máximo em 30 minutos. A administração subsequente de  $\text{ClO}_4^-$  inibe competitivamente a captação de iodeto da tireoide pelo simportador de sódio/iodeto (NIS). Em caso de iodação e organificação não afetados, menos de 10% do radioiodo captado pela tireoide é eliminado. No caso de defeito de organificação de iodeto, o radiodio é eliminado, total ou parcialmente (RIS-STALPERS e BIKKER, 2010). Os pacientes que perdem mais de 80% do iodeto captado (descarga de iodeto >80%) são considerados portadores de defeito total de incorporação de iodo, e aqueles com perda de iodeto entre 25 e 80% (descarga entre 25 e 80%) apresentam defeito parcial da incorporação de iodo (SANTOS et al., 1999).



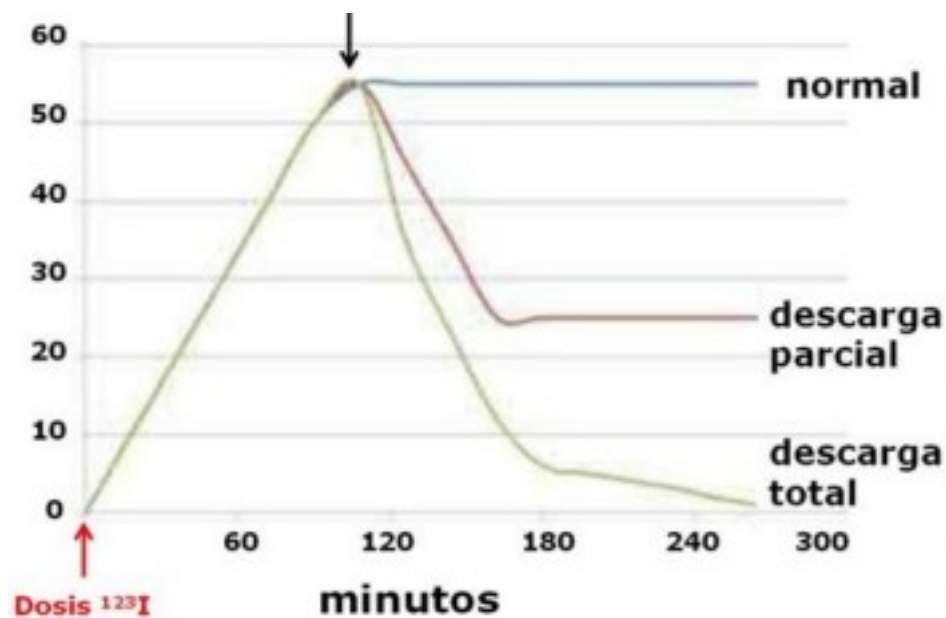


Figura 4 Gráfico mostrando o teste de perclorato em pacientes com descarga total e parcial.

Em estudos anteriores de nosso grupo, mutações no gene da TPO foram identificadas em pacientes com hipotireoidismo congênito, entre elas as mutações Arg665Trp e Cys296Alafs\*21 (NEVES, 2008; SILVA, 2013). As mutações foram identificadas em dois irmãos com HC que apresentavam bócio fetal, diagnosticados na 28ª e 26ª semana de gestação no exame ultrassonográfico. Dados advindos de sequenciamento dos pais confirmaram que o pai era portador das mutações p.Cys296Alafs\*21 e p.Gln660Glu (no mesmo alelo) e a mãe da p.Arg665Trp (UMEKI, 2002) ambos portadores não afetados (SILVA, 2013). Neste caso, a mutação Gln660Gly não é expressa nos pacientes, pois seu quadro de leitura é afetado pela deleção p.Cys296Alafs\*21DelT886 que se encontra no mesmo alelo e introduz um novo codon de parada. O fenótipo dos pacientes foi considerado grave, pois o bócio fetal indica a deficiência de hormônios tireoidianos já no período pré-natal (RIBAUT e et al., 2009).

19

### 3. Mutações

#### 3.1p.Cys296Alafs\*21DelT886

Esta nova mutação ocorre no éxon 8 por uma deleção de T na posição 886 (c.DelT886) que altera o quadro de leitura da proteína a partir do resíduo 296, e introduz um novo códon de parada no resíduo 316 da proteína (Figura 5).

#### 3.2 p.Arg665Trp

Esta mutação ocorre no éxon 11 pela troca 2083 C>T, substituindo arginina por triptofano na posição 665 da proteína. Estudos *in vitro* prévios revelaram que esta mutação não permite a localização correta da TPO na membrana apical do tireócito o que inibe sua função e a síntese hormonal (UMEKI *et al.*, 2002).

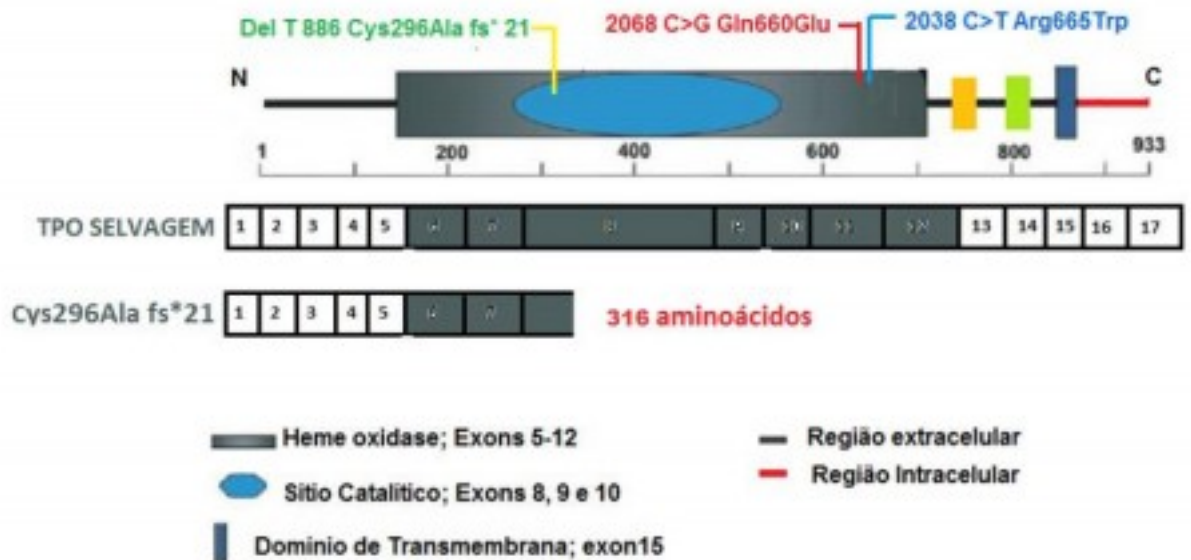


Figura 5 Representação dos alelos com as mutações Cys296Alafs\*21, Gln 660Glu e Arg665Trp. Comparação do tamanho de uma proteína de TPO selvagem em relação a uma proteína de TPO mutada DelT886Cys296Alafs\*21, de tamanho menor (SILVA, 2013).

20

#### 4. Objetivos

##### Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo realizar estudo funcional *in vitro* da atividade enzimática da TPO portadora de duas mutações diferentes, Arg665Trp e Cys296Alafs\*21 e verificar se havia correlação genótipo/fenótipo.

##### Objetivos específicos

- 1) Introduzir a mutação Arg665Trp no plasmídeo pCDNA-TPO por mutagênese sítio dirigida e confirmar a sua presença por sequenciamento.
- 2) Padronizar a técnica de quantificação da atividade da TPO utilizando o reagente Amplex UltraRed.
- 3) Expressar as TPOs selvagem e mutadas em linhagens de células de mamíferos.
- 4) Avaliar a atividade da TPO selvagem e mutadas utilizando o reagente Amplex UltraRed

21

## 5. Pacientes e Métodos

### 5.1 Pacientes

As características clínicas e mutações dos pacientes (PV e DV) portadores das mutações deste estudo estão na Tabela 1. Ambos os pacientes tiveram diagnóstico de bócio fetal.

**Tabela 1.: Características laboratoriais e moleculares dos pacientes deste estudo**

Paciente  Valor de Ref.	Sexo	TSH μUI/mL (0,3-5)	T4L ng/dL (0,8-2,0)	TG ng/mL (1,35-35)	Mutação
PV *	M	135,0	0,57	26,59 <sup>#</sup>	p.Cys296Alafs*
DV <sup>&amp;</sup>	M	83,89 <sup>&amp;</sup>	-	530,6 <sup>#</sup>	21 Gln660Gly p.Arg665Trp

Testes realizados: (\*) por cordocentese, (&) 48hs após o nascimento, (#) após início do tratamento com levotiroxina, (-): não realizados.

### 5.2 Mutagênese sítio dirigida

Neste projeto a mutação p.Arg665Trp foi introduzida no plasmídeo pCDNA 3.1, que contém o cDNA da TPO selvagem clonagem, por mutagênese sítio dirigida utilizando o kit *Quick Change Lightning e XL II (Agilent Technologies)* e os primers desenhados no site fabricante (Tabela 2). Para reações de 50μL foram usados 50ng do plasmídeo e 125ng de cada primer. As reações foram então incubadas a 95°C por 1 minuto, passaram por 18 ciclos de denaturação por 20 segundos à 95°C, 10 segundos de anelamento à 60°C e extensão à 68°C por 4 minutos e 15 segundos, e depois mais 1 ciclo de 68°C por 5 minutos. Após o procedimento, as reações foram colocadas em gelo por 2 minutos e então incubadas à 37°C por 30 segundos com a enzima DpnI, para posterior transformação. O plasmídeo contendo a mutação p.Cys296Alafs\*21 foi construído previamente utilizando a mesma técnica (SILVA, 2013).



**Tabela 2. Primers utilizados para mutagênese sítio dirigida no cDNA (DNA codificante) TPO.**

Mutação	Primer	Sequência
p.Arg665Trp	Foward	5' AGATGAAGGCTCTGTGGGACGGTGA 3'
p.Arg665Trp	Reverse	5' CCAGTCACCGTCCCACAGACCCTTCA 3'

### 5.3 Transformação bacteriana

As bactérias XL-10 Gold competentes (*Agilent Technologies*) foram transformadas com a técnica de choque térmico. Para montar as reações foram usados 45uL de bactérias e 2 uL de  $\beta$ -mercapthoethanol. Elas foram incubadas em gelo por 2 minutos e então foram adicionadas 2uL do reagente para mutagênese. As bactérias sofreram choque térmico a 42°C por 30 segundos seguido por 2 minutos em gelo. Foi adicionado 500uL de meio SOC (2% triptona, 2,5% extrato de levedura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub> e 20mM glicose) aquecido à 37°C. As reações foram agitadas 180 rpm à 37°C por 1 hora e plaqueadas em placas de Petri de 10 cm com meio LB (1% triptona, 1% NaCl, 0,5% extrato de levedura, 2% ágar e 100ug/mL ampicilina) e mantidas à 37°C *overnight*.

### 5.4 Extração DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada utilizando o *Kit Wizard Midiprep (Promega)*, segundo protocolo do fabricante. Ao longo do projeto foram utilizados os seguintes plasmídeos: pCDNA-WT contendo o gene da TPO selvagem, pCDNA vetor vazio usado como controle negativo, pCDNA-p.Cys296Alafs\*21 e pCDNA-p.Arg665Trp contendo os genes da TPO mutados.

### 5.5 Quantificação do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro *NanoDrop 2000*, e a concentração e pureza do material calculada por espectrofotometria através da leitura de densidade ótica a 260nm e 280nm.

### 5.6 Polymerase chain reaction (PCR)

Para confirmar que as mutações inseridas estavam presentes nos plasmídeos e nas células transfectadas, antes e durante a padronização do protocolo para avaliação de atividade enzimática, foram realizadas PCRs utilizando o estojo comercial *MasterMix Promega* nas seguintes concentrações: 1X MasterMix 2X, 50 ng de DNA, 0,5uL primer forward 10uM, 0,5uL primer reverse 10 uM (Tabela 3) em 8uL de volume final de reação. As amostras foram denaturadas à 96 °C por 4 minutos, seguidas por 40 ciclos de amplificação: 96°C 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 2 minutos e então mais 1 ciclo de 10 minutos à 72°C no equipamento *Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler*. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1,5% com 0,1% de SyBr Safe (*Invitrogen*) em foto documentador.

**Tabela 3. Primers desenhados para PCR e sequenciamento do cDNA (DNA codificante) da TPO.**

Primer	Exons de TPO	Sequência	Fragmentos
cTPO2-F cTPO2-R	5-8	5' AATACAGGCCCATCACAGGAG 3' 5' AGCGGTAGAAGGGCAGACA 3'	425 pb
cTPO3-F cTPO3-R	7-8	5' GGC TGA CTG CCA GAT GAC TT 3' 5' GGC ACG AAG GGC AGG TA 3'	335 pb
5TP6 3TP6	10-12	5' AATTCCAGCACCTTGGAT 3' 5' CCTCTGTGCATCCGTGAA 3'	344 pb

### 5.7 Sequenciamento

As amostras foram amplificadas por PCR e então sequenciadas pelo método de Sanger com os mesmos primers usados para as reações de PCR, no equipamento *ABI 377 (Applied Biosystems)* e utilização do estojo comercial *DNA Sequencing Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems)*. As reações continham 1uL *DNA Sequencing Big Dye*, 0,5uL primer forward 10uM, 4 uL da reação de PCR, 1,5 uL *sequencing*

3uL de H<sub>2</sub>O. Todas as sequências foram comparadas à sequência do gene de TPO referência presente na base de dados (número de acesso TPO: GenBank NT\_ 000547).

### 5.8 Linhagem Celular

---

Foram utilizadas as linhagens de células HeLa, derivada de câncer cervical e HEK293A, derivada de rins embrionários humanos, como hospedeira dos plasmídeos para os testes de atividade enzimática. Ambas foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium high glucose* (DMEM) com Penicilina-Estreptomicina (0.01ug/mL), fungizona (250ug/mL) e 10% de soro fetal bovino e mantidas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> até atingirem a confluência necessária para realização dos experimentos.

### 5.9 Avaliação da sensibilidade da célula HeLa ao antibiótico geneticina

---

Para confirmar a concentração que inibe o crescimento e selecionar clones transfectados estáveis, a célula HeLa foi cultivada com concentrações de geneticina de: 2000ug/mL, 1500ug/mL, 1000 ug/mL, 700 ug/mL, 500 ug/mL e 300 ug/mL durante 14 dias. Ao final do experimento foi escolhida concentração de 600ug/mL para selecionar os clones estáveis.

### 5.10 Transfecção

---

Para a transfecção foram preparados dois tubos eppendorfs de 1,5mL com 100uL de Opti-MEM em temperatura ambiente para cada amostra a ser transfectada. Em um foi diluído 6uL de lipofectamina e no outro 2ug de DNA. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, as duas soluções foram misturadas, homogeneizadas gentilmente e incubadas à temperatura ambiente novamente por 20 minutos. Para as transfecções utilizando Lipofectamina 3000 foram adicionados 5uL do reagente P3000. Enquanto isso as células foram lavadas 2 vezes com meio DMEM (sem fungizona e sem penicilina-estreptomicina). Após o período de incubação, foram adicionados à solução de Opti-MEM, DNA e Lipofectamina 800uL de DMEM (sem fungizona e sem penicilina-estreptomicina), homogeneizados e adicionados às células. Depois foi realizada uma incubação de 5 horas à

37°C e então adicionado 1mL de meio DMEM incompleto.

25

Na manhã seguinte, a solução de transfecção foi trocada por DMEM completo (10% de soro fetal bovino, 0,01ug/mL penicilina-estreptomicina e 250ug/ML fungizona).

(*Lipofectamine® 3000 DNA Transfection Reagent Protocol, 2013*) (*Lipofectamine™ 3000 Reagent Protocol, Invitrogen*).

### 5.11 Extração de DNA de Células de Mamíferos

---

A extração de DNA de células de mamífero seguiu o seguinte protocolo. Assim que a placa de 10mL atingiu 100% de confluência, as células foram tripzinadas, centrifugadas por 5 minutos a 1.500 rpm e ressuspendidas em 800uL de meio DMEM completo. O volume total foi passado para um eppendorf de 1,5mL e centrifugado por 1 minuto a 10.000 rpm, o sobrenadante foi então descartado e foram adicionados ao pellet 0,6mL de TEN-Buffer, 12uL de SDS 10% (concentração final 0,2%) e 10uL de proteinase K 100ug/mL. A mistura foi incubada *overnight* à 37°C para uma digestão completa e eficiente. No dia seguinte, foram adicionados 240uL de NaCl saturado e o tubo foi agitado vigorosamente por 15 segundos, sem utilização de vórtex. Após a agitação, a amostra foi centrifugada por 15 minutos à 5.000g, cada tubo com sobrenadante contendo o DNA desproteinizado foi transferido para dois tubos eppendorfs de 1,5mL usando pipetas de boca larga. Foi adicionado 1 volume de ETOH absoluto, centrifugado 10 minutos à 4.000g em 4°C. O sobrenadante foi retirado, e foram adicionados 500uL de ETOH 70% para retirar o excesso de sal e então centrifugado por 1 minuto à 4.000g em 4°C. O sobrenadante formado foi retirado, a amostra incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e então foram adicionados novamente 500uL ETOH 70% e realizada uma última centrifugação de 1 minuto à 4.000g em 4°C. Depois do novo sobrenadante ser retirado, a amostra foi seca no equipamento *SpeedVac* por 10 minutos, ressuspendida em 30uL de H<sub>2</sub>O MilliQ, mantida por 30 minutos à 37°C para dissolução completa do DNA e quantificada no aparelho *NanoDrop 2000*.

### 3.12 Padronização do Protocolo de Amplex UltraRed

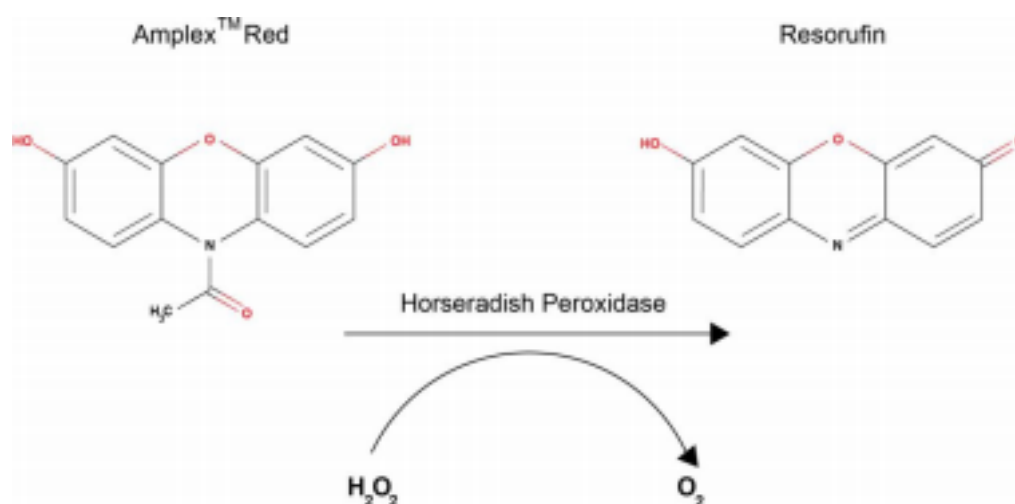
---

A atividade de tireoperoxidase foi avaliada utilizando o reagente *Amplex®UltraRed Enzyme Assays (Invitrogen)*, um substrato incolor que reage com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), o agente oxidante necessário para catalisar a reação da TPO, gerando a resorufina que

é fortemente fluorescente (Figura 6) e pode ser lida em espectrofotômetro, com excitação

26

mínima em 545nm e emissão máxima em 590nm. Inicialmente foi necessário padronizar o teste com o reagente *Amplex UltraRed*. Os protocolos testados foram adaptados de estudos publicados previamente (FORTUNATO et al., 2010) (GODLEWSKA et al., 2014) (NARUMI, 2017).



*Figura 6 Conversão de AmplexRed em resorufina pela ação da peroxidase na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Adaptado de Amplex UltraRed Enzyme Assays (Invitrogen))*

### Experimento 1 e 2

Para o primeiro experimento de padronização foram plaqueadas  $4 \times 10^5$  de células HeLa pCDNA-WT e pCDNA e crescidas por 48 horas em placas de seis poços com meio suplementado com 20uM hemina. No dia do teste, as células foram lavadas 2 vezes com 1mL de PBS 1x. Depois, 0,5mL de Mix de Reação (10mM KI, 30.000U/mL, superóxido dismutase (SOD), 10mM Amplex UltraRed em PBS 1x) foi adicionado. A reação foi iniciada adicionando 25uL  $\text{H}_2\text{O}_2$  1mM. Aliquotas de 20uL do sobrenadante foram retirados em intervalos de 1 minuto durante 8 minutos e imediatamente colocadas em placa de 96 poços contendo 80uL de Stop Mix (200.000U/mL catalase, 30.000U/mL SOD em PBS 1x) que cessa a atividade enzimática. Depois, a fluorescência foi medida em *Spectramx M3 Molecular Device* usando excitação a 530nm e emissão a 590nm.

27

Para o segundo experimento mantivemos as condições descritas, alterando apenas os intervalos para 1 minuto durante 5 minutos. Além disso, a leitura foi realizada novamente após 30 minutos. O valor de atividade foi considerado como o valor da fluorescência subtraído o negativo da reação e considerado 100% o valor da linhagem contendo o pCDNA.

Para todos os experimentos, foi utilizado como controle negativo uma solução de 20uL de Mix de Reação e 80uL de Stop Mix. Para as análises, o valor de fluorescência basal gerado por esse controle negativo foi descontado.

### Experimento 3 e 4

---

Para os experimentos 3 e 4 foi seguido um protocolo de células em suspensão e não mais aderidas às placas, baseado em (NARUMI et al., 2017), utilizando as mesmas células transfectadas de forma estável (HeLa pCDNA-WT e pcDNA). Também foram testados tempos diferentes.

Primeiro,  $4 \times 10^5$  células foram plaqueadas em placas de seis poços contendo meio DMEM completo e 20uM hemina. Foram crescidas por 48h. No dia do experimento, as células foram desaderidas da placa com tripsina, centrifugadas e ressuspensas em 5mL de meio DMEM completo e então contadas em câmara de Neubauer. O volume equivalente a  $4 \times 10^4$  células foi distribuído em eppendorfs de 1,5mL. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos à 1.500 rpm e as células ressuspensas em 130uL de Mix de Reação, preparado da mesma maneira que os experimentos 1 e 2. Aliquotas de 20uL foram retiradas nos tempos de 3, 5, 7 e 9 minutos e imediatamente colocadas em placa de 96 poços contendo 80uL de Stop Mix, também preparado da mesma maneira que nos experimentos 1 e 2.

Com a finalidade de testar a metodologia, avaliamos diferentes concentrações de células para o protocolo de células em suspensão,  $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$  e  $6 \times 10^4$ . A medição de fluorescência foi feita após 3, 5, 7, 9 e 30 minutos de incubação a 37°C com agitação.

### Experimento 5

---

Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células, dessa vez HEK293A, em placas de seis poços. Após 24h, foram transfectadas, com Lipofectamina 3000, com o pCDNA-WT em duas concentrações diferentes, 1ug e 2ug, e com 2 ug de pCDNA. Após 24h, a solução de transfecção foi trocada

por meio DMEM completo e hemina 20mM. No dia seguinte realizamos teste para avaliação de atividade enzimática.

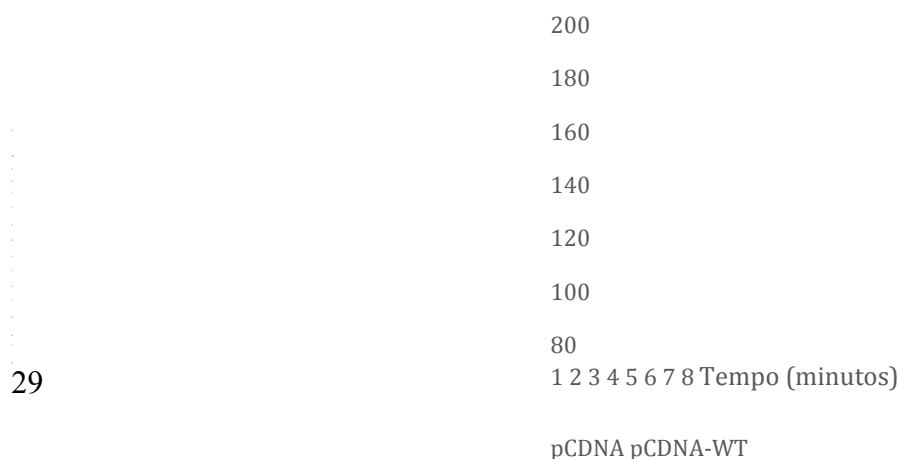
Para o Mix de Reação foi diluído um novo reagente *Amplex UltraRed* 10mM em DMSO e a SOD retirada. Para o Stop Mix foi preparada uma nova catalase (200.000U/mL), dessa vez mantida à 4°C.

As células foram lavadas 2 vezes com 1ml de PBS 1x. Depois, 0,5mL de Mix de Reação foi adicionado (10mM KI e 10mM *Amplex UltraRed* em PBS 1x). A reação foi iniciada adicionando 5,6uL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,088M. Alíquotas de 20uL foram retiradas das placas contendo células e Mix de Reação nos tempos de 0, 3, 5, 8, 15 e 3º minutos, imediatamente colocadas em poços de uma placa de 96 contendo 80uL de Stop Mix (200.000U/mL catalase, 30.000U/mL SOD em PBS 1x).

## 6. Resultados

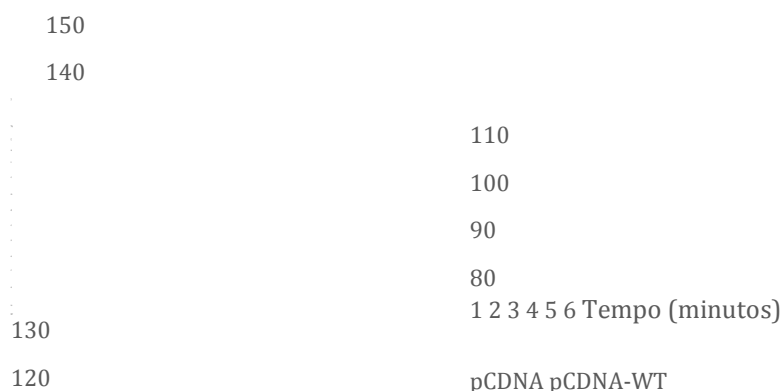
### 6.1 Experimentos 1 e 2

Nos dois primeiros experimentos para padronizar a avaliação de atividade enzimática foram utilizadas as células HeLa-pCDNA-WT e HeLa-pcDNA estabilizadas, mantidas em cultivo com geneticina (600ug/mL). Nestes experimentos não foi possível chegar a um resultado conclusivo, pois a atividade de HeLa pCDNA-WT e pcDNA se mostraram instáveis. No primeiro experimento os resultados foram satisfatórios, foi observada alta fluorescência na linhagem HeLa-pCDNA-WT, aumento de quase 100% comparado com a linhagem HeLa pcDNA. No entanto o experimento seguinte, utilizando a mesma técnica os resultados não se repetiram e diferiram do demonstrado em estudos anteriores que foram utilizados como base (Figura 7 e 8), indicando que a técnica ainda precisaria passar por ajustes.



*Figura 7 Resultado do Experimento 1 - Avaliação da atividade de TPO por Amplex UltraRed nos tempos de 1 à 8 minutos com intervalos de 1 minuto utilizando os mutantes*

*HeLa pCDNA-WT e HeLa pcDNA.*

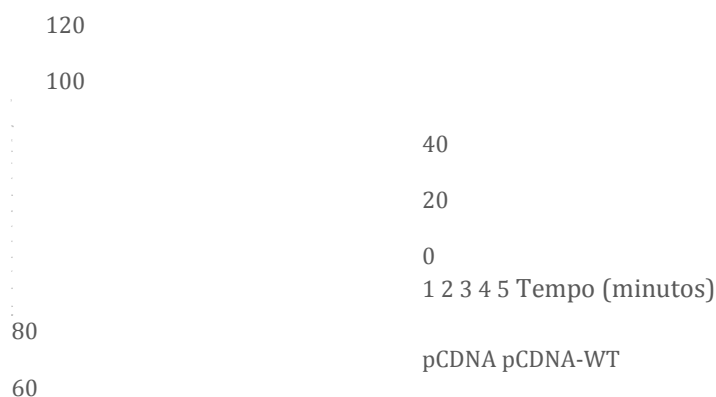


*Figura 8. Resultado do Experimento 2 - Avaliação da atividade da TPO por Amplex UltraRed nos tempos de 1 à 6 minutos com intervalos de 1 minuto utilizando linhagem HeLa mutante com plasmídeos pCDNA-WT e pcDNA.*

30

## 6.2 Experimento 3

O experimento 3 foi realizado que tem como premissa a medição da atividade enzimática de TPO utilizando células em suspensão. Foram utilizadas as células HeLa pCDNA WT e HeLa-pcDNA em tempos de 3, 5, 7, 9 e 30 minutos. Os resultados obtidos mostram valores incoerentes, com baixa diferença enzimática inicial da HeLa pCDNA-pCDNA-WT e HeLa pCDNA-pcDNA e alta atividade do HeLa pCDNA-a partir de 20 minutos de reação (Figura 9).



*Figura 9 Resultado do Experimento 3 - Avaliação da atividade da TPO por Amplex UltraRed nos tempos de 1 à 5 minutos linhagem HeLa pCDNA-WT e pcDNA.*



### 6.3 Experimento 4

O experimento 3 foi repetido, porém dessa vez sem adição de Stop Mix nos poços para que o desenvolvimento da reação sem intervenções pudesse ser acompanhado e foram utilizadas diferentes concentrações de células HeLa pCDNA e pCDNA-WT e o tempo de reação foi de 30 minutos (Figura 10).

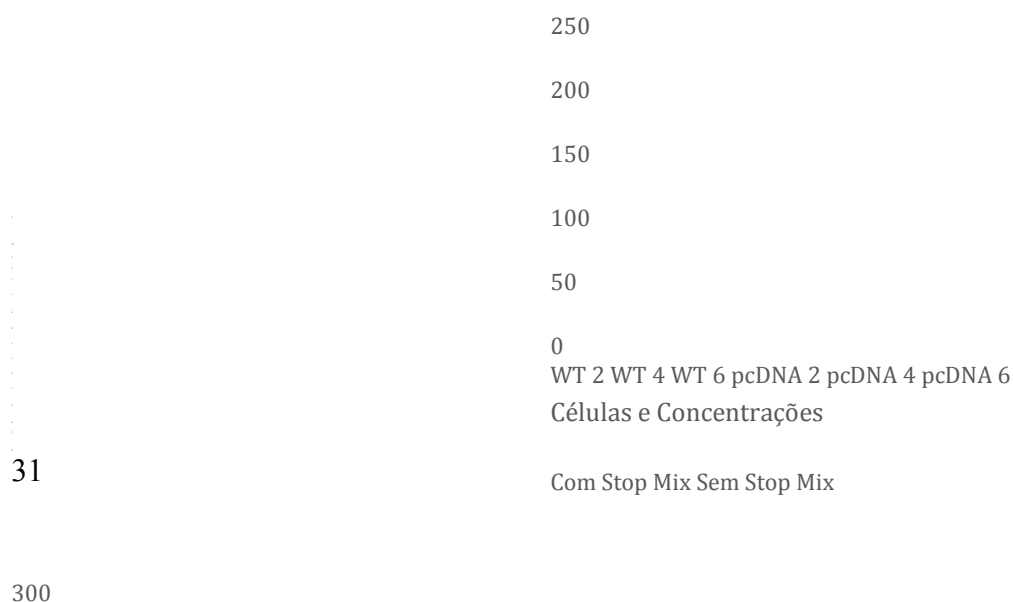


Figura 10 Resultado do Experimento 4 - Avaliação da atividade da TPO por Amplex UltraRed após 30 minutos utilizando linhagem HeLa mutante com plasmídeos pCDNA-WT e pCDNA. (2) 2x10<sup>4</sup>, (4) 4x10<sup>4</sup> e (6) 6x10<sup>4</sup> células utilizadas para a realização do experimento.

Com o 3° e 4° experimentos foi verificado que os 30 minutos de incubação não provocam uma diferença proporcional.

Além disso, no 4° experimento nota-se que houve uma maior atividade da HeLa pCDNA-WT em comparação com a HeLa pCDNA, o que indica o início da padronização do protocolo, porém, quando o mesmo teste foi preparado para os mutantes, o resultado foi incoerente (Figura 11) e não condizia com o esperado.

80 70 60 50 40 30 20 10 0

*Figura 11 Gráfico com experimento mostrando fluorescência de células HeLa pCDNA, pCDNA-WT, pCDNAp.Arg665Trp e pCDNACys286Alafs\* e leitura realizada após 30 minutos, que são incoerentes com o resultado esperado.*

#### 6.4 Verificação da presença de TPO nas linhagens

---

À fim de entender o que poderia estar acontecendo, e suspeitando de perda dos plasmídeos das linhagens estáveis ou trocas, foram feitas amplificações por PCRs a partir do DNA extraído das linhagem HeLa-pCDNA-WT, HeLa-pcDNA, HeLa-pCDNA-p.Arg665Trp e HeLa-pCDNA-p.Cys296Alafs\*21. Não foi observada amplificação do cDNA da TPO o que sugeriu que poderiam ter sido eliminados mesmo com o cultivo com antibiótico. Para confirmar

este resultado, outro pesquisador do grupo realizou Western Blot (Figura 12) com os extratos proteicos das mesmas linhagens e somente houve marcação na HeLa-pCDNA-WT, confirmando a perda da TPO nos mutantes, adquirindo resistência ao meio com antibiótico.



pCDNAWT

pcDNA pCDNApArg665Trp pCDNAcys296Alafs\*21

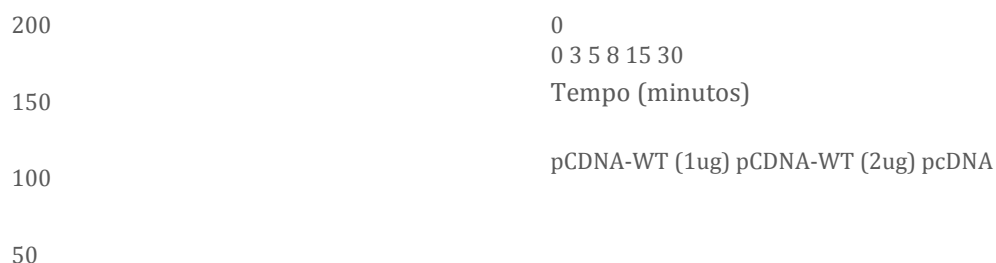
*Figura 12 Western Blot mostrando proteína apenas para pCDNA-WT 1) HeLa pcDNA; 2) HeLa pCDNApArg665Trp 3) pCDNAp.Cys296Alafs\*21 e 4) pCDNA-WT*

### 6.5 Experimento 5

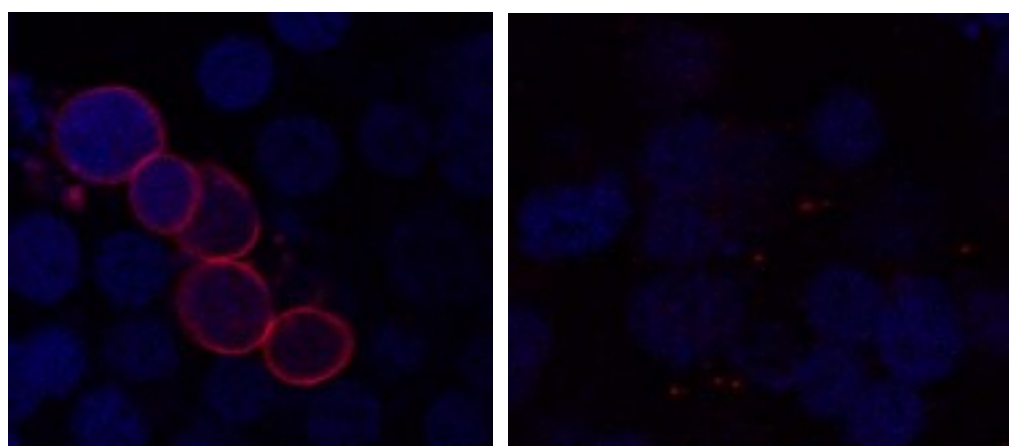
Com base nos resultados anteriores, os protocolos foram revistos e os experimentos foram recomeçados utilizando a linhagem HEK293A com os plasmídeos transfectados transitoriamente.

No 5º experimento foi possível confirmar que o protocolo havia sido padronizado corretamente, pois HEK293A pCDNA-WT mostrou atividade superior à HEK293A pcDNA. É possível visualizar que a atividade da pCDNA-WT é até 2 vezes maior que atividade de pcDNA (Figura 13), e os melhores resultados foram obtidos com 15 e 30 minutos de incubação. A

presença da TPO nas células transfectadas foi confirmada por imunofluorescência realizada por outro pesquisador do grupo (Figura 14).



*Figura 133 Resultado do Experimento 5 - Avaliação da atividade da TPO por Amplex UltraRed nos tempos de 3, 5, 8, 15 e 30 minutos utilizando linhagem HEK293A com mutantes pCDNA-WT e pcDNA.*



*Figura 14 Imunofluorescência confirmando a presença da HEK 293A com TPO-WT na membrana da célula na primeira imagem, e ao lado células que foram transfectadas com vetor vazio pCDNA, portanto, sem expressão de TPO na membrana.*

35

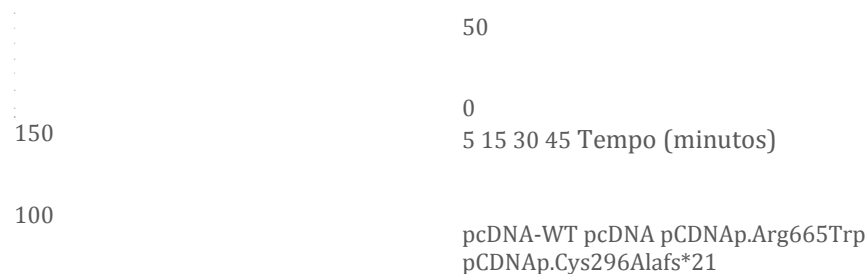
## 6.6 Experimento 6

Com a padronização consolidada no 5º experimento, as mutações pCDNA p.Cys296Alafs\*21e pCDNA-p.Arg665Trp foram analisadas. O protocolo foi seguido da mesma maneira, com exceção que os tempos avaliados foram de 0, 5, 15, 30 e 45 minutos.

As atividades enzimáticas da TPO nas células transfectadas com os plasmídeos com as diferentes mutações, quando comparada com a linhagem que expressava a TPO pcDNA-WT, com valores podendo ser comparados aos apresentados pela mutação vazia (Figura 15).

250

200



*Figura 155 Resultado do Experimento 6 - Avaliação da atividade da TPO por Amplex UltraRed nos tempos de 5, 15, 30 e 45 minutos para linhagem HEK293A com os mutantes pCDNA-WT, pcDNA, pCDNA-p.Cys296Alafs\*21 e pCDNA-p.Arg665Trp.*

36

## 7. Discussão

Estudos prévios de nosso laboratório identificaram diferentes mutações de TPO em pacientes brasileiros com hipotireoidismo congênito por disormonogênese com defeito parcial ou total de descarga de iodeto no teste de perclorato (NASCIMENTO, 2003), ou em pacientes com bócio fetal o que sugere um grave defeito de síntese hormonal. Assim, no presente estudo foi avaliado o efeito de duas mutações na atividade enzimática da TPO, e verificado se haveria correlação genótipo-fenótipo pois as mutações foram identificadas em dois irmãos com diagnóstico de bócio fetal.

Foram investigadas as mutações p.Cys296Alafs\*21, não descrita na literatura, e a p.Arg665Trp, que apesar de já ter sido investigada funcionalmente (UMEKI et al., 2002), foi incluída neste estudo para determinar sua atividade com a mesma metodologia da primeira, pois estão em heterozigose composta nos pacientes, e ainda serviu como um controle de baixa atividade enzimática para TPO.

Inicialmente foi necessário padronizar a técnica para avaliar a atividade da TPO utilizando o reagente *Amplex UltraRed*. Isto pois este reagente é indicado para quantificar a concentração de  $H_2O_2$  na presença de excesso de uma peroxidase. Esta padronização teve como base os trabalhos previamente publicados que sugeriam que era um método sensível (FORTUNATO et al., 2010) (GODLEWSKA et al., 2014) (NARUMI, 2017), se comparado a outros métodos como o de oxidação de guaicol utilizado em trabalhos anteriores (UMEKI et al., 2002). Foi testada a técnica com células aderidas e células em suspensão, com tempos diferentes e diferentes diluições dos reagentes. Foi possível determinar que o armazenamento correto dos reagentes utilizados e o tempo de armazenamento são de extrema relevância. A principal suspeita para os primeiros resultados inconclusivos foi a oxidação rápida do reagente *Amplex UltraRed*, uma vez que com uma nova diluição, foram obtidos os resultados esperados. Outros parâmetros importantes foram: tempos maiores de incubação da reação (a partir de 15

minutos) e maior concentração de células utilizadas para a transfecção transiente que permitiram obter maiores valores de atividade enzimática no protocolo de células aderidas. Não demos continuidade à padronização com células em suspensão pois já tínhamos um protocolo para continuar os trabalhos. Durante o projeto houve problemas com a perda da expressão de TPO nas células estabilizadas, mesmo utilizando antibiótico para seleção, confirmando a necessidade de avaliar a expressão do gene de interesse ao longo das culturas das linhagens estabilizadas. Devido ao curto tempo para concluir o projeto decidimos continuar os trabalhos com transfecções transientes nas células HEK293A.

37

Os resultados obtidos com o protocolo padronizado indicaram perda da atividade da TPO de ambos mutantes, com valores de fluorescência semelhantes aos do vetor vazio pCDNA. Em estudos funcionais anteriores da mutação pCDNA-p.Arg665Trp a TPO mutante não foi localizada na membrana plasmática por imunofluorescência e microscopia imunoeletrônica (UMEKI et al., 2002). Nesse mesmo estudo por ensaios de Western Blot e imunocoloração, foi observada menor expressão das proteínas TPO mutadas em comparação à da selvagem. Os autores sugeriram que essa diferença poderia ser explicada pelo dobramento impróprio das proteínas TPO mutadas, promovendo degradação e prejudicando o transporte para a membrana plasmática (UMEKI et al., 2002). Estudos preliminares por imunofluorescência de nosso laboratório sugerem que a deleção p.Cys296Alafs\*21 tampouco se localizaria na membrana.

Desse modo, é possível sugerir que a atividade enzimática da TPO nesses pacientes foi afetada pelas mutações pelo: 1) dobramento incorreto das proteínas mutadas e/ou 2) localização incorreta das TPO mutadas na membrana do tireócito. E, embora mais estudos são necessários para completar a caracterização funcional das duas mutações deste projeto, estes resultados preliminares sugerem uma importante perda de atividade enzimática da TPO que poderia prejudicar a produção dos hormônios tireoidianos nos pacientes, não sendo suficiente para suprir as necessidades fetais durante o desenvolvimento gestacional, acarretando desse modo, no HC severo com bócio fetal.

É importante mencionar que durante a gravidez, o desenvolvimento fetal depende do hormônio tireoidiano materno, especialmente durante o primeiro trimestre, antes que a síntese do hormônio tireoidiano fetal comece, aproximadamente, com 11 semanas de gestação. Depois disso, os hormônios tireoidianos fetais são necessários para um desenvolvimento saudável.

Mutações em genes associados às disormonogênese, TG, TPO, NIS e DUOXA2 foram identificadas em pacientes com bócio fetal, geralmente transmitidos de forma autossômica recessiva, e alguns estudos sugerem haver expressão monoalélica (BORGEL et al., 2005;

REYNOLD et al., 2006; STOUPE, et al., 2005 e TANASE-NAKAO et al., 2020). Estudos sobre mutações inativadoras de atividade enzimática da TPO já demonstraram que as características clínicas, como valores de TSH, Tg e T4L, podem variar muito entre diferentes pacientes que possuem as mesmas mutações (RIVOLTA et al., 2007; SIFFO et al., 2018) o que demonstra a necessidade de mais investigações e estudos funcionais sobre o tema.

38

## 8. Conclusão

Foi possível verificar que as mutações p.Cys296Ala e p.Arg665Trp diminuem a atividade enzimática da TPO *in vitro*, o que poderia explicar o quadro de HC severo e presença de bócio fetal nos pacientes portadores das mutações.

39

## 9. Referências

AVBELJ, Magdalena et al. **High prevalence of thyroid peroxidase gene mutations in patients with thyroid dysmorphogenesis**. European Journal of Endocrinology, v. 156, n. 5, p. 511–519, 2007.

BIKKER, Hennie et al. **Identification of five novel inactivating mutations in the human thyroid peroxidase gene by denaturing gradient gel electrophoresis**. Human Mutation, v. 6, n. 1, p. 9–16, 1995.

BÖRGEL, Kirsten et al. **Intrauterine therapy of goitrous hypothyroidism in a boy with a new compound heterozygous mutation (Y453D and C800R) in the thyroid peroxidase gene. A long-term follow-up**. American Journal Of Obstetrics And Gynecology, [S.L.], v. 193, n. 3, p. 857-858, set. 2005. Elsevier BV.

BRUST, Ester. **Análise Molecular de Pacientes com Hipotireoidismo Congênito por defeito na incorporação de iodo**. Dissertação (Mestrado). 2014.

CASTANET, Mireille et al. **Nineteen Years of National Screening for Congenital Hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors**. The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism, [S.L.], v. 86, n. 5, p. 209-214, 2001. The Endocrine Society.

DEGROOT, Leslie J. e NIEPOMNISZCZE, Hugo. **Biosynthesis of thyroid hormone:**

**Basic and clinical aspects.** Metabolism, v. 26, n. 6, p. 665–718, 1977.

DELADOËY, Johnny et al. **Pseudodominant inheritance of goitrous congenital hypothyroidism caused by TPO mutations: Molecular and in silico studies.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 93, n. 2, p. 627–633, 2008.

DELANGUE, F et al. **Principles and practice of endocrinology and metabolism**, 3rd ed, ch 18. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1990. p. 252-263.

ESPOSITO, Claudio et al. **PAX 8 activates the enhancer of the human thyroperoxidase gene.** Biochemical Journal, v. 331, n. 1, p. 37–40, 1998.

40

FISHER, Delbert A. et al. **Screening for congenital hypothyroidism: Results of screening one million North American infants.** The Journal of Pediatrics, v. 94, n. 5, p. 700– 705, 1979.

FORTUNATO, Rodrigo Soares et al. **Functional consequences of dual oxidase thyroperoxidase interaction at the plasma membrane.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 95, n. 12, p. 5403–5411, 2010.

FUGAZZOLA, L. et al. **Monoallelic expression of mutant thyroid peroxidase allele causing total iodide organification defect.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2003.

GODLEWSKA, Marlena et al. **A redundant role of human thyroid peroxidase propeptide for cellular, enzymatic, and immunological activity.** Thyroid, v. 24, n. 2, p. 371– 382, 2014.

GODLEWSKA, Marlena et al. **Thyroid Peroxidase Revisited – What’s New ?**  
**Authors.** Horm Metab Res, v. 51, p. 765–769, 2019.

GRÜTERS, Annette e KRUDE, Heiko. **Detection and treatment of congenital hypothyroidism.** Nature Reviews Endocrinology, v. 8, n. 2, p. 104–113, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.160>>.

GURIA, Srikanta et al. **Functional analysis of thyroid peroxidase gene mutations detected in patients with thyroid dyshormonogenesis.** International Journal of



Endocrinology, v. 2014, 2014.

HANLEY, Patrick e LORD, Katherine e BAUER, Andrew J. **Thyroid disorders in children and adolescents: A review**. JAMA Pediatrics. [S.l.]: American Medical Association. , 1 Out 2016

HASHEMIPOUR, Mahin et al. **Thyroid peroxidase gene mutation in patients with congenital hypothyroidism in Isfahan, Iran**. International Journal of Endocrinology, 2012.

HINTON, Cynthia F. et al. **Trends in incidence rates of congenital hypothyroidism related to select demographic factors: Data from the United States, California, Massachusetts, New York, and Texas**. Pediatrics, v. 125, n. SUPPL. 2, 2010.

41

KAPLOWITZ, Paul B. **Neonatal Thyroid Disease: Testing and Management**. Pediatric Clinics of North America, v. 66, n. 2, p. 343–352, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2018.12.005>>.

KIMURA, Shioko et al. **Structure of the Human Thyroid Peroxidase Gene: Comparison and Relationship to the Human Myeloperoxidase Gene**. Biochemistry, v. 28, n. 10, p. 4481–4489, 1989.

KITANAKA, Sachiko; TAKEDA, Ayak et al. **A novel compound heterozygous mutation in the thyroglobulin gene resulting in congenital goitrous hypothyroidism with high serum triiodothyronine levels**. Journal Of Human Genetics, v. 51, n. 4, p. 379-382, 14 fev. 2006. Springer Science and Business Media LLC.

KIZYS, Marina M L et al. **DUOX2 Mutations Are Associated With Congenital Hypothyroidism With Ectopic Thyroid Gland**. The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 102, n. 11, p. 4060-4071, 28 jun. 2017. The Endocrine Society.

KLEIN, Alan H. e MELTZER, Stephanie e KENNY, Frederic M. **Improved prognosis in congenital hypothyroidism treated before age three months**. The Journal of Pediatrics, v. 81, n. 5, p. 912–915, 1972.

LAIN, Samantha et al. **Are lower TSH cutoffs in neonatal screening for congenital hypothyroidism warranted?** European Journal of Endocrinology, v. 177, n. 5, p. D1–D12, 2017.

LARSEN, P et al. **Thyroid physiology and diagnostic evaluation of patients with thyroid disorders**. In: Larsen PR, Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, editors. Williams' textbook of endocrinology. 10th ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2003.p.331-73

MITCHELL, Marvin L. e HSU, Ho Wen e SAHAI, Inderneel. **The increased incidence of congenital hypothyroidism: Fact or fancy?** Clinical Endocrinology, v. 75, n. 6, p. 806– 810, 2011.

NARUMI, Satoshi et al. **Molecular basis of thyroid dyshormonogenesis: Genetic screening in population-based Japanese patients**. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 96, n. 11, p. 1838–1842, 2011.

42

NARUMI, Satoshi et al. **Mild thyroid peroxidase deficiency caused by TPO mutations with residual activity: correlation between clinical phenotypes and enzymatic activity**. Endocrine Journal, [S.L.], v. 64, n. 11, p. 1087-1097, 2017.

NASCIMENTO, Antonio C et al. **Thyroperoxidase gene mutations in congenital goitrous hypothyroidism with total and partial iodide organification defect**. Thyroid : official journal of the American Thyroid Association, v. 13, n. 12, p. 1145–51, 2003.

NEVES, Solange Caires. **Hipotireoidismo congênito : rastreamento e identificação de mutações no gene TPO em pacientes com defeito parcial ou total de incorporação de iodeto**. Dissertação (Mestrado). 2008.

OLIVIERI, Antonella et al. **Epidemiology of congenital hypothyroidism**. Thyroid Diseases in Childhood: Recent Advances from Basic Science to Clinical Practice. [S.l: s.n.], 2015.

OLIVIERI, Antonella et al. **Multiple factors influencing the incidence of congenital hypothyroidism detected by neonatal screening**. Hormone Research in Paediatrics, v. 83, n. 2, p. 86–93, 2015.

PEREIRA, Rita Calado et al. **Recém-nascido com massa cervical**. Hospital Albert Einstein. São Paulo , v. 9, n. 1, p. 78-80, Mar, 2011.

RASTOGI, Maynika V e LAFRANCHI, Stephen H. **Congenital hypothyroidism Definition and classification**. Orphanet Journal of Rare Diseases, v. 5, n. 17, p. 1–22, 2010.

RIBAUT, Virginie et al. **Experience with intraamniotic thyroxine treatment in nonimmune fetal goitrous hypothyroidism in 12 cases.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 94, n. 10, p. 3731–3739, 2009.

RIS-STALPERS, Carrie e BIKKER, Hennie. **Genetics and phenomics of hypothyroidism and goiter due to TPO mutations.** Molecular and Cellular Endocrinology. [S.l: s.n.], Jun 2010

RIVOLTA, Carina M. et al. **Two compound heterozygous mutations (c.215delA/c.2422T→C and c.387delC/c.1159G→A) in the thyroid peroxidase gene responsible for congenital goitre and iodide organification defect.** Clinical Endocrinology, 43

v. 67, n. 2, p. 238–246, 2007.

RUF, Jean e CARAYON, Pierre. **Structural and functional aspects of thyroid peroxidase.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 445, n. 2, p. 269–277, 2006.

SALERNO, Mariacarolina et al. **Long-term cardiovascular effects of levothyroxine therapy in young adults with congenital hypothyroidism.** Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 93, n. 7, p. 2486–2491, 2008.

SANTOS, Cecilia L.S. et al. **A novel mutation in the TPO gene in goitrous hypothyroid patients with iodide organification defect.** Clinical Endocrinology, v. 51, n. 2, p. 165–172, 1999.

SIFFO, Sofia et al. **Molecular analysis of thyroglobulin mutations found in patients with goiter and hypothyroidism.** Molecular and Cellular Endocrinology, v. 473, p. 1–16, 15 Set 2018.

SILVA, Marlon. **Avaliação funcional de mutações no gene da tireoperoxidase identificadas em pacientes com hipotireoidismo congênito com defeito de incorporação de iodeto.** Dissertação (Mestrado), 2013.

SIMM, Diemud et al. **Two novel mutations in the human thyroid peroxidase (TPO) gene: Genetics and clinical findings in four children.** Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics, 2009.

STOUPA, Athanasia et al. **First case of fetal goitrous hypothyroidism due to**

**SLC5A5/NIS mutations.** European Journal Of Endocrinology, v. 183, n. 5, p. 1-5, nov. 2020.

SUN, Feng et al. **The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes.** European Journal of Endocrinology, v. 178, n. 6, p. 623–633, 2018.

SZINNAI, Gabor et al. Sodium/Iodide Symporter (NIS) Gene Expression Is the Limiting Step for the Onset of Thyroid Function in the Human Fetus. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S.L.], v. 92, n. 1, p. 70-76, jan. 2007.

TANASE-NAKAO et al. **Fetal Goitrous Hypothyroidism and Polyhydramnios in a**  
44

**Patient with Compound Heterozygous DUOXA2 Mutations.** Hormone Research In Paediatrics, [S.L.], v. 90, n. 2, p. 132-137, 2018. S. Karger AG.

TAUROG, Alvin et al. **Mechanism of Simultaneous Iodination and Coupling Catalyzed by Thyroid Peroxidase.** Archives Of Biochemistry And Biophysics, [S.L.], v. 330, n. 1, p. 24-32, jun. 1996.

UMEKI, Kazumi et al. **Two novel missense mutations in the thyroid peroxidase gene, R665W and G771R, result in a localization defect and cause congenital hypothyroidism.** European Journal of Endocrinology, v. 146, n. 4, p. 491–498, 2002.

WONG, S. C. e NG, S. M. e DIDI, M. **Children with congenital hypothyroidism are at risk of adult obesity due to early adiposity rebound.** Clinical Endocrinology, v. 61, n. 4, p. 441–446, 2004.

## Anexos

### Comité De Ética Em Pesquisa

No início da pesquisa o projeto foi cadastrado no CEP da UNIFESP, mas não foi avaliado pois houve mudanças das regras. Agora é necessário somente uma declaração dos pesquisadores em anexo.

CEP/Outros | Formulários ▾ | Área Restrita |

CEP Nº **Ainda não atribuído** Enviado em: 20/02/2020

Título: "Avaliação funcional das mutações no gene da tireoperoxidase identificadas em pacientes com hipotireoidismo congênito"

Documentos anexados: 1.) 1. Projeto de Pesquisa

Data	Documento	Comentário do CEP	Status
20/02/2020	Projeto de Pesquisa	(00/00/0000)	Aguardando checagem da documentação

[Visualizar](#) [Sair](#)

46

## DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE

**Título do Projeto de Pesquisa:** Efeito de mutações identificadas em pacientes com Hipotireoidismo Congênito (HC) na atividade da tireoperoxidase (TPO) Pesquisador Responsável: Ileana G S Rubio

Campus UNIFESP/ Departamento: Campus Diadema, Departamento de Ciências Biológicas

Objetivo acadêmico: TCC

Nome do aluno: Vitoria Sousa Frutuoso

Equipe de Pesquisa:-

Local onde será realizada a pesquisa: Laboratório de Ciências Moleculares da Tireoide E-mail para contato: Ileana.rubio@unifesp.br

Eu, **pesquisador responsável** pelo projeto acima especificado, **declaro que:**

1. O projeto de pesquisa não incluirá participantes de pesquisa, nem utilizará materiais obtidos diretamente de seres humanos (por exemplo células, sangue periférico, tecidos, entre outros), nem utilizará imagem/som/questionários/entrevistas/grupo focal que permitam sua identificação individual, dados de prontuários de assistência do paciente, fichas de cadastros pessoais e/ou fichas escolares;

2. O projeto de pesquisa não utilizará animais vertebrados não humanos nem materiais obtidos diretamente de animais vertebrados não humanos (por exemplo células, sangue periférico, tecidos, entre outros);
3. Estou ciente de que se nesta pesquisa houver manipulação genética (organismos geneticamente modificados), será necessário obter carta de aprovação da Comissão Interna de Biossegurança da Unifesp (CIBio), e que é minha responsabilidade obtê-la antes do início da pesquisa (Lei nº 11.105/2005 <http://www2.unifesp.br/reitoria/orgaos/comissoes/cibio/index.php?cod=apresenta>);
4. Estou ciente de que caso a pesquisa envolva acesso a patrimônio genético brasileiro e/ou conhecimento tradicional, o projeto deverá ser cadastrado no sistema auto declaratório SisGen, conforme Lei nº 13.123/2015, antes da sua publicação e/ou comercialização do produto, sendo de minha responsabilidade realizar e manter este cadastro atualizado (<https://sisgen.gov.br/>);
5. Estou ciente de que caso os dados utilizados nesta pesquisa não forem de acesso público e/ou se a pesquisa não for realizada em local público, será necessário obter o documento de autorização emitido pela instituição em que será realizada a pesquisa e/ou detentora dos dados a serem utilizados, onde deverá conter as atividades que serão desenvolvidas e assinatura do dirigente institucional ou pessoa por ele delegada, com identificação de cargo/função e respectiva assinatura, antes do início da pesquisa (Lei nº 12.527/2011);

47

6. Estou ciente de que se houver coleta de exemplares biológicos e/ou se a pesquisa for realizada em unidades de conservação federais ou em cavidade natural subterrânea, será necessário obter documento de autorização do Ministério do Meio Ambiente, conforme Instrução Normativa nº 03/2014 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, e é de minha responsabilidade obter este documento antes do início da pesquisa (<https://www.icmbio.gov.br/sisbio/>);
7. Estou ciente de que se o projeto tiver a possibilidade de gerar conhecimento passível de proteção intelectual (patentes, direito autoral, novos tratamentos, marcas, softwares, cultivares, segredo industrial), é minha responsabilidade entrar em contato com a Agência de Inovação Tecnológica e Social (Agits);
8. Estou ciente de que se houver uso do Hospital São Paulo ou algum de seus ambulatórios ou setores será necessário anexar autorização expedida pelo Comitê de Ensino, Pesquisa e Extensão do Hospital São Paulo (CoEPE/HSP), e é minha responsabilidade obter este ofício antes do início da pesquisa (email: [coep@huhsp.org.br](mailto:coep@huhsp.org.br));
9. Estou ciente de que se houver o uso de agentes radioativos, será necessário obter documento de autorização do Núcleo de Proteção Radiológica (NPR) e é minha responsabilidade obter este documento antes do início da pesquisa (para maiores informações sobre o NPR, contato: [npr@unifesp.br](mailto:npr@unifesp.br); VOIP:2882);
10. O referido projeto cumpre as normas legais vigentes relacionadas à proteção intelectual, boas práticas e ética em pesquisa e que será minha responsabilidade zelar pela correta condução do projeto de pesquisa;
11. Comprometo-me a manter a confidencialidade dos dados coletados e gerados pela pesquisa bem como manter a privacidade de seus conteúdos. Também é minha a responsabilidade não repassar os dados coletados ou o banco de dados em sua íntegra, ou parte dele, a pessoas não envolvidas na equipe da pesquisa;
12. Declaro a precisão de todas as informações acima fornecidas e comprometendo-me a informar todos os demais pesquisadores envolvidos no projeto sobre elas.

São Paulo 08 de fevereiro de

2021



Ileana G S Rubio, Pesquisador Responsável



Vitória Sousa Frutuoso, Orientanda

48

De acordo,

Ileana G. S Rubio, Chefe do Departamento ou Diretor de  
Campus